

file copy



**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup>:</b> <b>C07H 1/08, 21/00, C12N 15/10, C12P 19/34, C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/21849</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 17. August 1995 (17.08.95)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP95/00445 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 8. Februar 1995 (08.02.95)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 44 04 361.9      11. Februar 1994 (11.02.94)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> QIAGEN GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4, D-40724 Hilden (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> BASTIAN, Helge [DE/DE]; Am Webersbüschken 22, D-30822 Mettmann (DE). GAUCH, Simone [DE/DE]; Benzenbergweg 23, D-42781 Haan (DE). COLPAN, Metin [DE/DE]; Uhlandstrasse 5, D-45219 Essen (DE). FEUSER, Petra [DE/DE]; Belvedere-Strasse 46, D-50933 Köln (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Deichmannhaus am Hauptbahnhof, D-50667 Köln (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title: PROCESS FOR SEPARATING DOUBLE-STRANDED/SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID STRUCTURES</b>  <b>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR TRENNUNG VON DOPPELSTRANG/EINZELSTRANGNUKLEINSÄURESTRUKTUREN</b>  <b>(57) Abstract</b>  A chromatographic process is disclosed for separating nucleic acid mixtures into their double-stranded and single-stranded fractions. All nucleic acids are simultaneously adsorbed in a mineral substrate, then separated by fractionated elution into double-stranded and single-stranded nucleic acids, or double-stranded and single-stranded nucleic acids of a sample are selectively adsorbed in a mineral substrate. Also disclosed are solutions and a kit for carrying out this process.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur chromatographischen Trennung von Nukleinsäuregemischen in ihre doppel- und einzelsträngigen Anteile, indem die Nukleinsäuren insgesamt gleichzeitig an einem mineralischen Träger adsorbiert werden und danach die Trennung in doppel- oder einzelsträngige Nukleinsäure durch fraktionierte Elution erfolgt oder indem doppel- oder einzelsträngige Nukleinsäure einer Probe selektiv an einem mineralischen Träger adsorbiert werden, sowie Lösungen und einen Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren zur Trennung von  
Doppelstrang/Einzelstrangnukleinsäurestrukturen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur chromatographischen Trennung von Nukleinsäuregemischen in ihre doppel- und einzelsträngigen Nukleinsäureanteile, indem Gesamtnukleinsäuren gleichzeitig an einen mineralischen Träger absorbiert werden und danach die Trennung in doppelsträngige Nukleinsäure und einzelsträngige Nukleinsäure durch fraktionierte Elution erfolgt oder indem doppelsträngige Nukleinsäure oder einzelsträngige Nukleinsäure einer flüssigen Probe selektiv an einen mineralischen Träger absorbiert werden sowie Lösungen und Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Präparation von Nukleinsäuren, sowohl RNA wie auch DNA, hat zunehmend an Bedeutung gewonnen. Dabei werden beispielsweise die biologischen Quellen, aus denen die RNA oder DNA isoliert werden soll, aufgeschlossen, beispielsweise durch mechanische Einflüsse oder chemische Einflüsse, wie Behandlung mit Detergenzien etc. So folgt auf den Zellaufschluß zur Gewinnung der Nukleinsäure üblicherweise eine Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation oder eine Extraktion mit Phenol. Diese Methoden sind zwar zur Isolation von Nukleinsäuren geeignet, weisen aber Nachteile auf, die ihre Handhabung erschweren. So setzt die Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation den Einsatz von zeit- und kostenintensiver Ultrazentrifugation voraus, wohingegen der Umgang mit Phenol aus arbeitsschutzrechtlichen Erwägungen nicht unbedenklich erscheint.

So hat es in der Vergangenheit nicht an Versuchen gefehlt, die Isolation von Nukleinsäuren zu vereinfachen.

Die DE 36 39 949 A1, DE 40 34 036 A1 oder DE 41 39 664 A1 befassen sich z.B. mit Verbesserungen der Nukleinsäurereinigung mittels chromatographischer Methoden unter Vermeidung apparativ aufwendiger Verfahren, wie der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Obwohl diese Methoden bereits beispielsweise gegenüber der Ultrazentrifugation oder Phenolextraktion einen Fortschritt darstellen, sind sie technisch relativ aufwendig und arbeitsintensiv. Da zur Fraktionierung oftmals mehrere Reinigungsschritte nacheinander durchgeführt werden müssen, ist die Bearbeitung insbesondere von kleinen Probenmengen z. B. durch Substanzverlust problematisch.

Die EP 0 389 063 A2 betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren. Dabei wird die Nukleinsäuren enthaltende Quelle in Gegenwart chaotroper Ionen aufgeschlossen und dann mit einem unter diesen Bedingungen Nukleinsäuren adsorbierendem Material behandelt. Als solches Material wird Diatomeenerde oder andere Siliciumoxid enthaltende mineralische Träger genannt. Es gelingt nach der in der EP 0 389 063 A2 genannten Methode RNA und DNA und RNA und ssRNA gleichzeitig zu isolieren. Eine wünschenswerte Fraktionierung der an dem Siliciumdioxidträger gebundenen Nukleinsäuren in DNA- und RNA-Anteile wird jedoch nicht erreicht. RNA kann dann durch Zugabe von RNase abgebaut werden, so daß die DNA übrig bleibt.

Gillespie et al. offenbaren im US-Patent-Nr. US 5,155,018 ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von biologisch aktiver RNA aus biologischen Quellen enthaltend RNA, DNA und andere Zellinhaltsstoffe. Dabei wird die RNA enthaltende Quelle mit Partikeln in Kontakt gebracht, welche silicagelhaltige Materialien wie feinverteilter Glas sind. Der Bindungspuffer, aus welchem die RNA an dem Material adsorbiert wird, ist angesäuerte chaotrope Salze enthaltende Lösungen. Unter diesen Bedingungen wird RNA aber nicht DNA an dem Silicamaterial gebunden. Die Verwendung von angesäuerten chaotropen Puffern besitzt den Nachteil,

daß bei der Ansäuerung Guanidiniumthiocyanat (GTC)-haltiger Bindungspuffer die Gefahr der Blausäurebildung besteht und somit besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden müssen. Weiterhin wird die DNA durch Säureeinwirkung zerstört. Darüberhinaus läßt sich nach diesem Verfahren eine DNA Aufreinigung aus der authentischen Probe nicht durchführen.

Little beschreibt in US-Patent-Nr. 5,075,430 ein Verfahren zur Reinigung von Plasmid- und anderer DNA, sowohl einzelsträngig wie auch doppelsträngig, durch Immobilisierung der DNA auf Diatomeenerde in Anwesenheit eines chaotropen Agens, woraufhin die DNA mit Wasser oder mit einem Puffer mit niedrigem Salzgehalt eluiert wird. Nach der Methode ist eine Reinigung von DNA/RNA nicht möglich.

M. A. Marko et al. beschreiben in "Analytical Biochemistry" 121, Seiten 382 bis 387 (1982) ein Verfahren zur Isolierung im großen Maßstab von hochgereinigter Plasmid-DNA unter Verwendung der alkalischen Extraktion und Bindung an Glaspulver. Eine Fraktionierung und getrennte Reinigung von RNA und DNA aus einer einzigen Probe wird nicht beschrieben.

An die Rohpräparation der Nukleinsäuren schließen sich Folgereaktionen an. Diese Folgereaktionen stellen bestimmte Anforderungen sowohl an die Isolierungsprozedur, als auch an die Reinheit und Integrität der isolierten Nukleinsäuren. Insbesondere wenn in der Folge enzymatische Amplifikationsreaktionen wie PCR (Polymerase Chain Reaction), LCR (Ligase Chain Reaction), NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) oder 3SR (self-sustained Sequence Replication) Anwendung finden, sollte die Präparation der Nukleinsäuren ohne die Gefahr von Kreuzkontaminationen anderer Proben möglich sein, und die isolierten Nukleinsäuren sollten frei von störenden Zellbestandteilen und/oder Metaboliten vorliegen. Die enzymatische

Amplifikation von DNA (z. B. PCR) oder RNA (z. B. RNA-PCR) gewinnt aufgrund ihrer Spezifität und Sensitivität nicht nur in der Grundlagenforschung, sondern zunehmend auch im medizinischen Bereich für diagnostische Zwecke an Bedeutung. So beispielsweise für die Detektion von Nukleinsäuresequenzen aus kleinsten Mengen an Zellen und/oder Geweben oder Biopsiematerialien oder zum Nachweis von viralen Nukleinsäuren aus Blut oder Plasma. Für diese Anwendungen sind neben den genannten Anforderungen auch an Ausbeute und Reproduzierbarkeit des Verfahrens zur Nukleinsäureisolierung höchste Anforderungen gestellt.

Ein der Erfindung zugrundeliegendes technisches Problem besteht darin, ein Verfahren anzugeben, mit dem es nicht nur gelingt RNA und DNA aus biologischen Proben wie Zell-Lysaten und Gewebelysaten getrennt voneinander aber aus derselben Probe stammend aufzureinigen, sondern generell doppelsträngige von einzelsträngige Nukleinsäuren. Das Verfahren sollte dabei möglichst kostengünstig arbeiten, indem beispielsweise preisgünstige unmodifizierte Trennmaterialien Verwendung finden können. Das Verfahren sollte darüber hinaus auch zur Probenvorbereitung für die Diagnostik geeignet und mit verschiedenen Amplifikationsmethoden kompatibel sein. Weiterhin sollen die bei der Diskussion des Standes der Technik angesprochenen Nachteile vermieden werden.

Überraschenderweise wird das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1 in seinen Verfahrensalternativen 1.1 bis 1.4 gelöst. Die Unteransprüche 2 bis 11 betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens, die Ansprüche 12 bis 21 Lösungen zur Verwendung im erfindungsgemäßen Verfahren bzw. die Verwendung dieser Lösungen und Anspruch 22 betrifft eine Zusammenstellung enthaltend die für das erfindungsgemäße Verfahren notwendigen Komponenten.

Im einzelnen stellt sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Fraktionierung von doppelsträngigen und einzelsträngigen Nukleinsäure-Strukturen aus biologischen Quellen in folgenden Verfahrensalternativen dar.

Die zu trennende Nukleinsäurearten (einzel- und doppelsträngige) enthaltende Probe wird mit mindestens einem mineralischen Träger behandelt, wobei die Behandlungsbedingungen durch ein entsprechendes wäßriges Gemisch von Salzen, insbesondere chaotrope Substanzen und Alkoholgruppen enthaltender Substanz so eingestellt sind, daß überwiegend die einzelsträngige Nukleinsäure-Fraktion an einem ersten mineralischen Träger adsorbiert wird, während die doppelsträngige Nukleinsäure nicht adsorbiert wird. Die austretende doppelsträngige Nukleinsäure kann dann mit an sich bekannten Verfahren weiter bearbeitet werden. Die am ersten mineralischen Träger adsorbierte einzelsträngige Nukleinsäure wird nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten eluiert unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser. Die nicht adsorbierte doppelsträngige Nukleinsäure, die aufgefangen wurde, kann weiter aufgereinigt werden, indem z.B. die Fraktion anschließend durch ein entsprechendes wäßriges Gemisch von Salzen, insbesondere chaotrope Substanzen, und alkoholgruppenhaltigen Substanzen auf solche Bedingungen eingestellt wird, daß die doppelsträngige Nukleinsäure an einem zweiten mineralischen Träger adsorbierbar und, nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten, eluierbar wird unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser.

In einer zweiten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden zur Trennung von einzelsträngiger Nukleinsäure und doppelsträngiger Nukleinsäure die Behandlungsbedingungen so eingestellt, daß Erdalkali-Ionen komplexierende Substanzen in Abwesenheit von Alkoholgruppen enthaltenden Substanzen in der Lösung enthalten sind, wobei die einzelsträngige Nukleinsäure

nicht an dem ersten mineralischen Träger adsorbiert wird und von der übrigen Probe abgetrennt werden kann. Die abgetrennte einzelsträngige Nukleinsäure kann dann mit an sich bekannten Verfahren weiter bearbeitet werden. Die doppelsträngige Nukleinsäure bindet jedoch überwiegend an dem ersten mineralischen Träger und kann, nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten, eluiert werden, unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser. Die so erhaltene doppelsträngige Nukleinsäure kann dann mit an sich bekannten Verfahren weiter bearbeitet werden.

Die nicht adsorbierte einzelsträngige Nukleinsäure, welche aufgefangen wurde, kann dann anschließend insbesondere durch Zugabe von Alkoholgruppen enthaltenden Substanzen auf solche Bedingungen eingestellt werden, daß die einzelsträngige Nukleinsäure dann an einem zweiten mineralischen Träger adsorbierbar und, nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten, eluierbar wird unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser.

Werden die Behandlungsbedingungen so eingestellt, daß Netz-, Wasch- oder Dispergiermittel in Abwesenheit von Alkoholgruppen aufweisenden Substanzen in der Lösung enthalten sind, wird die einzelsträngige Nukleinsäure unter diesen Behandlungsbedingungen nicht an einem ersten mineralischen Träger adsorbiert und kann mithin von der übrigen Probe abgetrennt und weiter verarbeitet werden. Die doppelsträngige Nukleinsäure bindet jedoch überwiegend an den ersten mineralischen Träger und kann nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser eluiert werden. Die eluierte doppelsträngige Nukleinsäure kann danach mit an sich bekannten Verfahren weiter bearbeitet werden.

Die nicht adsorbierte, aufgefangene einzelsträngige Nukleinsäure kann dann anschließend vorzugsweise durch Zugabe von Alkoholgruppen enthaltenden Substanzen auf solche Bedingungen eingestellt werden, daß die einzelsträngige Nukleinsäure dann an



einem zweiten mineralischen Träger adsorbierbar und, nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten, eluierbar wird unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser.

Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens gewährleistet die Fraktionierung von gemeinsam gebundener einzelsträngiger Nukleinsäure und doppelsträngiger Nukleinsäure. Dabei werden die Behandlungsbedingungen durch ein entsprechendes wäßriges Gemisch von Salzen, insbesondere chaotrope Substanzen und Alkoholgruppen enthaltenden Substanzen so eingestellt, daß die Gesamtnukleinsäure aus einzelsträngiger Nukleinsäure und doppelsträngiger Nukleinsäure an einem mineralischen Träger adsorbiert wird, gefolgt von einer Fraktionierung der an den ersten Träger gebundenen doppelsträngigen/einzelsträngigen Nukleinsäure durch selektive Elution der doppelsträngigen Nukleinsäure mittels Behandlung mit einer Lösung verminderter Ionenstärke und Konzentration einer Alkoholgruppen enthaltenden Substanz oder Elution der einzelsträngigen Nukleinsäure mittels einer Lösung enthaltend eine Erdalkali-Ionen komplexierende Substanz und/oder ein Netz-, Wasch- oder Dispergiermittel sowie eine oder mehrere Salzart(en), insbesondere chaotrope Substanzen. Im ersten Fall bleibt dann die einzelsträngige Nukleinsäure auf dem Träger gebunden, wohingegen im zweiten Falle die doppelsträngige Nukleinsäure an dem mineralischen Träger gebunden bleibt. Die jeweils eluierte Fraktion kann dann mit an sich bekannten Verfahren weiter bearbeitet werden.

Die Einstellung der Behandlungsbedingungen mit Alkoholgruppen enthaltenden Substanzen und Salzen, insbesondere chaotrope Substanzen zur Trennung der Nukleinsäuren erfolgt erfindungsgemäß unter Zugrundelegung der nachstehenden physiko-chemischen Grundlagen, die hier zum ersten Mal formuliert sind.

Fig. 1 zeigt die Bindung einzelsträngiger/doppelsträngiger Nukleinsäure am Beispiel einzelsträngiger RNA und doppelsträngiger DNA. Es wird die RNA/DNA-Bindung aus einem Gewebelysat an einen mineralischen Träger in Abhängigkeit der Konzentration einer Alkoholgruppen enthaltenden Substanz (hier Ethanol) und einer chaotropen Substanz (hier GTC) beschrieben. Unter der Voraussetzung, daß die Konzentration einer der Substanzen, Alkohol oder chaotroper Substanz, konstant ist, ist festzustellen, daß bei hoher Alkoholkonzentration und/oder Menge chaotroper Substanz, beide Nukleinsäurearten (RNA/DNA) am mineralischen Träger gebunden werden. Unterschreitet die Konzentration einer oder beider Substanzen (Alkohol oder chaotropes Reagenz) einen bestimmten Wert, dann bindet keine der Nukleinsäure in nennenswertem Maße an dem mineralischen Träger. Dazwischen binden überraschenderweise RNA und DNA so unterschiedlich an den mineralischen Träger, daß dies zur Trennung der Nukleinsäuren ausgenutzt werden kann. So können - ausgehend von Zellen - nach Lyse der Zellen mit hoher Konzentration an chaotropen Substanzen, durch anschließende Zugabe einer Alkoholgruppen enthaltenden Substanz oder eines Gemisches aus Alkoholgruppen enthaltender Substanz und Wasser oder Puffer, Konzentrationen von chaotroper Substanz und Alkoholgruppen enthaltender Substanz so eingestellt werden, daß eine selektive Bindung der RNA erzielt wird, während die DNA im Durchbruch verbleibt. Im Beispiel gemäß Figur 1 würde man eine Konzentration von 1,75 M GTC und 30 Vol% Ethanol wählen, um eine Trennung von RNA von DNA durch fraktionierte Bindung zu erreichen.

Andererseits kann unter Bedingungen hoher Konzentration an Alkoholgruppen enthaltender Substanz und/oder hoher Konzentration an chaotroper Substanz eine simultane Bindung von einzelsträngiger Nukleinsäure und doppelsträngiger Nukleinsäure am mineralischen Träger erreicht werden, und durch Verringerung der Konzentration an Alkoholgruppen enthaltender Substanz

und/oder chaotroper Substanz zunächst die Desorption der doppelsträngigen Nukleinsäure eingeleitet werden. Die einzelsträngige Nukleinsäure bleibt dabei gebunden und eluiert bei noch weiterer Verringerung der Konzentration einer oder beider Substanzen. Im Beispiel gemäß Fig. 1 würde man Konzentrationen von 1,75 M GTC und 45 Vol% Ethanol wählen, um eine Bindung der Gesamtnukleinsäure zu erreichen. Wie in Beispiel 8 exemplarisch verdeutlicht wird, würde man zur selektiven Desorption der DNA eine Konzentration von 0,3 M GTC und 10 Vol% Ethanol wählen.

Es ist mithin möglich, die RNA und DNA durch Adsorption an einem mineralischen Träger zu trennen, oder aber zunächst die Gesamtnukleinsäure an den mineralischen Träger zu adsorbieren und die einzelsträngige Nukleinsäure oder doppelsträngige Nukleinsäure selektiv zu eluieren.

Gegebenenfalls können vor der Elution der jeweiligen Nukleinsäure (einzelssträngige Nukleinsäure oder doppelsträngige Nukleinsäure) auch Waschschrirte durchgeführt werden.

Die Elution erfolgt dann jeweils unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser. Die zuerst vom mineralischen Träger desorbierte Nukleinsäure wird anschließend durch Erhöhung der Ionenstärke und/oder der Konzentration Alkoholgruppen enthaltender Substanzen so eingestellt, daß die doppelsträngige Nukleinsäure oder einzelsträngige Nukleinsäure an einem zweiten mineralischen Träger adsorbiert wird und, nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschrirten, eluiert wird unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser.

Da Nukleinsäuren beispielsweise auch in Kochsalz/Ethanol-Gemischen an mineralische Träger adsorbieren und unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser eluiert werden können, ist

anzunehmen, daß die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Salzlösungen nicht zwingend chaotrope Salze enthalten müssen, sondern daß jede Salzlösung in Kombination mit einer Alkoholgruppen enthaltenden Substanz Anwendung finden kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht in vorteilhafter Weise die Bearbeitung kleiner Probenmengen, gewährleistet eine einfache und sichere Handhabung unter Vermeidung von Präzipitationsschritten. Weiterhin ist das Verfahren gemäß der Erfindung wenig kosten- und personalintensiv durchführbar und kann in einfacher Weise die Bearbeitung einer Vielzahl von Proben gleichzeitig ermöglichen. Das Verfahren ist aufgrund seiner Vielseitigkeit und einfachen Handhabbarkeit auch für die Automatisierung geeignet.

Erfindungsgemäß können mit dem Verfahren aus Nukleinsäurestrukturen enthaltenden Quellen Doppelstrang/Einzelstrang-Nukleinsäurestrukturen getrennt werden. Als Quellen, die zu trennenden Nukleinsäurestrukturen beinhalten können, kommen die z.B. im Anspruch 7 genannten Quellen in Frage. Diese sind im einzelnen Zellkulturen, Gewebe jeder Art, Körperflüssigkeiten wie Blut, Plasma, Serum, Urin, Faeces, Mikroorganismen wie Bakterien, Viren wie Cytomegalie-Virus, HIV, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis- $\delta$ -Virus, Pflanzen, Pflanzenteile, Embryonen, Keimlinge, Früchte oder Nukleinsäuren enthaltende Gemische nach enzymatischen Reaktionen wie in vitro Transkription und/oder cDNA-Synthese und/oder reverse Transkription mit anschließender Polymerasekettenreaktion (PCR).

Zellen werden vorzugsweise zunächst in einem wäßrigen Lyse-System, welches chaotrope Substanzen und/oder andere Salze enthält, aufgeschlossen, indem im einfachsten Falle die Zellen damit versetzt werden. Gegebenenfalls kann durch mechanische Einwirkung der Prozeß des Aufschliessens beschleunigt werden.

Danach wird die so behandelte Probe, je nach Problemstellung welche Nukleinsäureart von der anderen getrennt werden soll, wie in den Verfahrensschritten 1.1 bis 1.4 gemäß Patentanspruch 1 beschrieben, weiter aufgearbeitet.

Einige der genannten Ausgangsmaterialien wie beispielsweise Bakterien können, aufgrund der Beschaffenheit ihrer Zellwände, nicht direkt in chaotrope Substanzen enthaltenden wäßrigen Systemen lysiert werden. Diese Ausgangsmaterialien müssen daher, bevor sie in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können, vorbehandelt werden, beispielsweise mit lytischen Enzymen.

Systeme zur Lysierung der die Nukleinsäure enthaltenden Quellen sind vorzugsweise Lösungen chaotroper Substanzen in einer Konzentration von 0,1 bis 10 M. Als chaotrope Substanzen kommen insbesondere Salze wie Natriumperchlorat, Guanidiniumhydrochlorid, Guanidinium-iso-thiocyanat/Guanidinium-thiocyanat, Natriumjodid, Kaliumjodid und/oder Kombinationen davon in Frage.

Auch wäßrige Lösungen enthaltend Salze wie Natriumchlorid, Lithiumchlorid, Kaliumchlorid, Natriumacetat, Magnesiumchlorid in einer Konzentration von 0,1 bis 10 M oder Harnstoff in entsprechenden Konzentrationen von 0,1 bis 10 M und/oder Kombinationen dieser Stoffe können als wäßrige Systeme zur Lyse bzw. Bindung der die Nukleinsäure enthaltenden Quellen verwendet werden.

Die Alkoholgruppen aufweisenden Substanzen sind vorzugsweise niedere aliphatische Alkohole mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen wie Methanol, Ethanol, Isopropanol, Butanol und Pentanol. Sie werden vorzugsweise in einer Konzentration von 1 bis 90 Vol.-% eingesetzt.

Der mineralische Träger besteht vorzugsweise aus porösen oder nicht porösen Metalloxiden oder Metallmischoxiden, Silicagel, Materialien, die überwiegend aus Glas bestehen, wie nicht modifizierte Glaspartikel, Glasmehl, Quarz, Aluminiumoxid, Zeolithe, Titandioxid, Zirkondioxid mit einer Partikelgröße des mineralischen Trägermaterials von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 1.000  $\mu\text{m}$  und einer Porengröße von 2 bis 1.000  $\mu\text{m}$ . Das poröse oder nicht poröse Trägermaterial kann in Form loser Schüttungen vorliegen oder als Filterschichten ausgebildet sein in Form von Filterschichten aus Glas, Quarz oder Keramik und/oder einer Membran, in der Silicagel angeordnet ist und/oder als Partikel oder Fasern aus mineralischen Trägern und Geweben aus Quarz oder Glaswolle vorliegen sowie Latex-Partikeln mit oder ohne funktionellen Gruppen oder Frittenmaterialien aus Polyethylen, Polypropylen, Polyvinyliden-fluorid, insbesondere ultra high molecular weight Polyethylen, high density Polyethylen.

Als Erdalkali-Ionen bindende Substanz kommt insbesondere Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder EGTA in Frage und als Netz-, Wasch- oder Dispergiermittel ist ein Sarkosinat einsetzbar.

Gewünschtenfalls können die erfindungsgemäß erhaltenen Nukleinsäuren durch weitere chromatographische Verfahren wie Anionenaustauscherchromatographie gereinigt werden.

Im erfindungsgemäßen Verfahren kann als einzelsträngige Nukleinsäure insbesondere RNA von doppelsträngiger Nukleinsäure (DNA) getrennt werden. Liegt DNA einzelsträngig vor, kann diese DNA dann auch von doppelsträngiger DNA, wie auch von doppelsträngiger RNA getrennt werden.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren zur Anwendung kommenden Lösungen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Als Lysepuffer und/oder Bindungspuffer kommen erfindungsgemäß

insbesondere wäßrige Lösungen enthaltend 0,5 bis 8,0 M Guanidinium-iso-thiocyanat/Guanidiniumthiocyanat und/oder Guanidinhydrochlorid, 0 bis 50 % Ethanol und/oder Isopropanol in Betracht.

Als Lösung zum Auswaschen bzw. Eluieren von an dem mineralischen Träger gebundenen Nukleinsäuren kommt eine wäßrige Lösung enthaltend 0,1 bis 3 M Guanidinium-iso-thiocyanat/Guanidiniumthiocyanat und/oder Guanidinhydrochlorid zusammen mit 1 bis 30 Vol.% Ethanol und/oder Isopropanol in Frage.

Als wäßriges Lösungssystem, das zum Binden von doppelsträngiger Nukleinsäure an mineralische Träger verwendet werden kann, kommt eine wäßrige Lösung enthaltend 1 bis 5 M Guanidin-iso-thiocyanat und/oder 1 bis 8 M Guanidinhydrochlorid mit 0,1 bis 5 % Sarkosinaten oder 5 mM bis 200 mM EDTA in Betracht. Zum Binden von doppelsträngiger Nukleinsäure kommt auch eine Lösung enthaltend 1 bis 5 M Guanidiniumthiocyanat und/oder 1 bis 8 M Guanidiniumhydrochlorid, 5 mM bis 200 mM EDTA oder EGTA in Frage.

Die erfindungsgemäß beanspruchte Zusammenstellung von Komponenten zur Durchführung des Verfahrens in einem Kit weist insbesondere zum Durchfluß geeignete Hohlkörper auf, in dem der oder die mineralische(n) Träger in der bereits weiter oben beschriebenen Form angeordnet ist (sind). Der mineralische Träger kann in loser Schüttung vorliegen, welche zwischen zwei Einrichtungen fixiert ist oder in Form von Membranen, die in dem Hohlkörper angeordnet sind. Desweiteren können in dem Kit Lösungen enthalten sein oder die Bestandteile für die Zusammenstellung der Lösungen in konzentrierter Form. Daraus kann dann der Anwender die jeweils benötigten Lösungen in der notwendigen Konzentration herstellen.

Ein weiterer vorteilhafter Bestandteil der Zusammenstellung ist eine Vorrichtung zur Homogenisierung der Lösung auf Zell-Lysaten. Eine besonders bevorzugte Vorrichtung zur Homogenisierung

ist in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP 95/00037 vorgeschlagen. Diese Vorrichtung besteht im wesentlichen aus mindestens zwei porösen Schichten, wobei die porösen Schichten abnehmende Porengröße aufweisen in Fließrichtung durch die Schichten gesehen. Beim Durchtritt des Zell-Lysats durch die abnehmende Porengrößen werden die viskosen Lösungen des Zell-Lysats homogenisiert.

Die Erfindung wird an den nachfolgenden Beispielen näher erläutert.

## **Materialien und Methoden**

### **1. Silica-Trägermaterialien**

Silica-Trägermaterialien wurden in Membranform oder als suspendierte Partikel eingesetzt.

#### **1.1. Silica-Membranen**

Zwei Lagen einer Silica-Membran (z.B. Glasfaserfilter der Firma Whatman) wurden, wie in P 43 21 904 beschrieben, in einer Zentrifugen-Chromatographiesäule ("spin-Säule") fixiert. Für membranförmige Trägermaterialien wurde nach dem Standardprotokoll "spin-Prozedur" (vgl. 4.1) vorgegangen.

#### **1.2. Silica-Partikel**

Verschiedene Silica-Partikel (z.B. der Firmen Merck, Darmstadt und Sigma, St. Louis) wurden als 50 %-Suspension im jeweils verwendeten Lysepuffer (vgl. 3.1) eingesetzt. Die mittleren Partikeldurchmesser betrugen je nach Material 0,5 bis 50  $\mu\text{m}$ . Es wurde nach dem Standardprotokoll "batch-Prozedur" (vgl. 4.2) vorgegangen.



## 2. Nukleinsäure enthaltende Quellen

### 2.1 Gewebe

Die zur Präparation eingesetzten Gewebe wurden sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff gefroren und bei - 70°C gelagert. Alternativ kann frisches Gewebe verwendet werden.

### 2.2. Pflanzen

Blätter wurden unter flüssigem Stickstoff im Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen und direkt zur Präparation eingesetzt oder bei - 70°C gelagert.

### 2.3. Zellkultur

Zellen wurden nach der Ernte zweimal mit PBS gewaschen und pelletiert. Aliquots mit entsprechender Zellzahl (bestimmt durch Auszählen in Thoma-Kammer) wurden frisch zur Präparation eingesetzt oder bei - 20°C gelagert.

Adhärent wachsende Zellen können alternativ in der Kulturschale gewaschen und durch Zugabe des jeweiligen Lysepuffers (vgl. 3.1) direkt in der Kulturschale lysiert werden.

### 2.4. Plasma

ACD-Blut wurde 10 min bei 3.000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erneut wie oben zentrifugiert. Der nach der zweiten Zentrifugation erhaltene Überstand wurde aliquotiert und bei - 70°C gelagert.

## 2.5. Bakterien

Kulturen wurden mit einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 - 0,8 angezogen. Aliquots mit der entsprechenden Zellzahl ( $1 OD_{600} = 10^9$  Zellen/ml) wurden pelletiert und die Zellpellets bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert oder frisch zur Präparation eingesetzt.

## 3. Reagenzien

### 3.1. Lysepuffer

- L1 4,5 M GTC, 25 mM NaCitrat pH 7,5, 0,7 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (MSH)
- L2 4,0 M GTC, 25 mM NaCitrat pH 7,5, 0,7 %  $\beta$ -MSH
- L3 5,0 M GTC, 50 mM TRIS/HCl pH 7,0
- L4 3,5 M GTC, 25 mM NaCitrat pH 7,5, 1 %  $\beta$ -MSH
- L5 2,5 M GTC, 25 mM NaCitrat pH 7,5, 1 %  $\beta$ -MSH, 30 % Ethanol
- L6 8,0 M GuHCl, 20 mM MOPS pH 7,0, 0,7 %  $\beta$ -MSH
- L7 3,0 M GTC, 25 mM NaCitrat pH 7,5, 1 %  $\beta$ -MSH
- L8 4,0 M GTC, 50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 1 % Sarkosyl
- L9 4,0 M GTC, 50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 25 mM EDTA

### 3.2. Bindungsreagenz

- B1 Ethanol
- B2 n-Butanol
- B3 Isopropanol
- B4 70 % Ethanol in Wasser
- B5 5,9 M GTC

### 3.3. Waschpuffer

W1	2,0 M GTC, 25 mM TRIS/HCl pH 7,5, 30 % Ethanol
W2	4,0 M GTC, 40 mM TRIS/HCl pH 7,5, 20 % Isopropanol
W3	1,0 M GTC, 25 mM TRIS/HCl pH 7,5, 20 % Ethanol
W4	5,0 M GuHCl, 15 mM MOPS pH 7,0, 37 % Ethanol
W5	0,5 M GTC, 25 mM TRIS/HCl pH 7,5, 10 % Ethanol

## 4. Standardprotokolle

### 4.1. "spin-Prozedur"

- 1) Nukleinsäure enthaltende Quelle mit Lysepuffer (vgl. 3.1.) versetzen und mittels eines Handhomogenisators vollständig homogenisieren
- 2) Bindungsreagenz (vgl. 3.2.) zugeben, um die jeweiligen Bindebedingungen einzustellen
- 3) Lysat auf die spin-Säule pipettieren und 15 Sekunden bei 10.000 Upm in einer Tischzentrifuge durch die Membran der spin-Säule zentrifugieren; falls das Volumen des Lysates das Füllvolumen der spin-Säule überschreitet, diesen Bindungsschritt wiederholen
- 4) den Säulendurchbruch gegebenenfalls weiteraufarbeiten oder verwerfen
- 5) 700 µl Waschpuffer (vgl. 3.3.) auf die spin-Säule pipettieren und wie in 3) beschrieben, zentrifugieren, um kontaminierende Zellbestandteile zu entfernen
- 6) die membrangebundenen Nukleinsäuren zweimal mit 700 µl 80 % Ethanol in Wasser salzfrei waschen, hierbei vorgehen wie in 5)
- 7) die spin-Säule zwei Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugieren, um Ethanol vollständig zu entfernen

- 8) 50 bis 100  $\mu$ l auf 80°C erwärmtes Wasser direkt auf die Membran der spin-Säule pipettieren und 1 Minute bei maximaler Drehzahl zentrifugieren, um die Nukleinsäuren zu eluieren; den Elutionsschritt gegebenenfalls wiederholen.

#### 4.2. "batch-Prozedur"

- 1) Nukleinsäure enthaltende Quelle mit Lysepuffer (vgl. 3.1.) versetzen und mittels eines Handhomogenisators vollständig homogenisieren
- 2) Bindungsreagenz (vgl. 3.2.) zugeben, um die jeweiligen Bindebedingungen einzustellen
- 3) 50  $\mu$ l Silica-Suspension (50 % im Lysepuffer) zugeben und zur Bindung der Nukleinsäuren 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, dabei mehrmals heftig aufwirbeln (vortexen)
- 4) 15 Sekunden bei 10.000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren, um das Silica-Material zu pelletieren
- 5) den Überstand abpipettieren und gegebenenfalls weiteraufarbeiten oder verwerfen
- 6) 700  $\mu$ l Waschpuffer (vgl. 3.3.) zum Pellet geben, heftig aufwirbeln (vortexen) bis das Pellet vollständig resuspendiert ist und wie in 4) zentrifugieren
- 7) Waschschrift 6) zweimal mit 700  $\mu$ l 80 % Ethanol in Wasser wiederholen, um das Silica-Material salzfrei zu waschen
- 8) pelletiertes Silica-Material 10 Minuten bei 56°C mit offenem Deckel trocknen
- 9) 50 bis 100  $\mu$ l Wasser zugeben, das Pellet durch heftiges Aufwirbeln (Vortexen) komplett resuspendieren und 10 Minuten bei 56°C inkubieren, dabei mehrmals heftig aufwirbeln (vortexen); diesen Elutionsschritt gegebenenfalls wiederholen
- 10) 1 Minute bei maximaler Drehzahl zentrifugieren und den Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen.

## 5. Elektrophoretische Methoden

Die isolierten Nukleinsäuren wurden auf Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen analysiert. Hierzu wurden 1,2 % Formaldehyd- oder 1,2 % 1 x TBE-Gele angefertigt.

Formaldehydgele wurden nach dem Lauf 3 bis 4 Stunden in Wasser, danach über Nacht in 10 µg/ml RNase A geschüttelt, um die RNA zu verdauen und somit die DNA besser sichtbar zu machen. TBE-Gele wurden ohne vorheriges Äquilibrieren RNase-verdaut.

Die im folgenden beschriebenen Beispiele verdeutlichen die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Alle hiernach isolierten Nukleinsäuren wurden elektrophoretisch analysiert und photometrisch quantifiziert. Der OD 260/280-Wert lag für alle Eluate zwischen 1.7 und 2.0.

### Referenzbeispiele 1 bis 5

#### *Isolierung von Gesamtnukleinsäure*

In den nachfolgend aufgeführten Referenzbeispielen 1 bis 5 wurden die Binde-, Wasch- und Elutionsbedingungen jeweils so gewählt, daß sowohl DNA als auch RNA an den mineralischen Träger binden und gemeinsam eluiert werden.

Es wird anhand dieser Beispiele die Verwendung verschiedener Alkohole (Ethanol, Isopropanol, Butanol) als Bindungsreagenz verdeutlicht.

#### Referenzbeispiel 1

##### *Isolierung von Gesamtnukleinsäure aus Nierengewebe*

Aus 15 mg Nierengewebe (Ratte) wurde Gesamtnukleinsäure nach dem Standardprotokoll 4.1 isoliert. Das Gewebe wurde mit 400 µl

L1 versetzt und homogenisiert, anschließend wurden 280 µl B1 zugegeben. Der erste Waschschrift wurde mit W1 durchgeführt, das Elutionsvolumen betrug 2 x 50 µl.

#### Referenzbeispiel 2

##### *Isolierung von Gesamtnukleinsäure aus Lebergewebe*

Aus 7 mg Lebergewebe (Ratte) wurde Gesamtnukleinsäure nach dem Standardprotokoll 4.1 isoliert. Das Gewebe wurde mit 300 µl L2 versetzt und homogenisiert, anschließend wurden 200 µl B2 zugegeben. Der erste Waschschrift wurde mit W1 durchgeführt, das Elutionsvolumen betrug 2 x 50 µl.

#### Referenzbeispiel 3

##### *Isolierung von Gesamtnukleinsäure aus HeLa-Zellen*

Aus  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen wurde Gesamtnukleinsäure nach dem Standardprotokoll 4.1 isoliert. Die Zellen wurden mit 400 µl L2 versetzt und homogenisiert, anschließend wurden 200 µl B1 zugegeben. Der erste Waschschrift wurde mit W1 durchgeführt, das Elutionsvolumen betrug 1 x 50 µl.

#### Referenzbeispiel 4

##### *Isolierung von Gesamtnukleinsäure aus Plasma*

Gesamtnukleinsäure aus Plasma wurde parallel nach Standardprotokoll 4.1 und 4.2 isoliert. Hierfür wurden jeweils 200 µl Plasma mit 800 µl L3 und 660 µl B2 versetzt und gemischt; homogenisieren war hier nicht erforderlich. Im Ansatz für die "batch-Prozedur" (4.2) wurden zusätzlich 40 µl Silica-Suspension zugegeben. Der erste Waschschrift wurde in beiden Ansätzen mit W2 durchgeführt, das Elutionsvolumen betrug 2 x 100 µl.

Beispiel 1*Fraktionierte Bindung von RNA und DNA bei konstanter GTC-Konzentration und steigender Ethanolkonzentration*

Die Abhängigkeit der RNA/DNA-Bindung an den mineralischen Träger bei konstanter GTC- und steigender Ethanolkonzentration wurde gezeigt, indem je Probenansatz 10 mg eines Nierengewebes in 350 µl L4 lysiert und zur Einstellung der Ethanolkonzentration je Ansatz 350 µl eines Ethanol/Wasser-Gemisches zugegeben wurde, dessen Ethanolgehalt zwischen 20 und 90 % Ethanol in Wasser lag. Zu einem weiteren Ansatz wurden 350 µl absoluter Ethanol gegeben. Dies entsprach in den jeweiligen Ansätzen Bindebedingungen von konstanter GTC-Konzentration 1,75 M und steigender Ethanolkonzentration im Bereich von 10 bis 50 % (vgl. Fig. 1).

Zu den so eingestellten Lysaten wurden in einer ersten Versuchsreihe je Ansatz 150.000 cpm eines <sup>32</sup>P-markierten 0.9 kb in vitro Transkripts gegeben und das Lysat auf den in einer Spin-Säule fixierten mineralischen Träger pipettiert. Es wurde 15 Sekunden bei 10.000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und die Menge der an die Säule gebundenen und der im Säulendurchbruch befindlichen Radioaktivität durch Cherenkov-Zählung bestimmt.

Die Versuchsreihe wurde wiederholt, wobei statt der <sup>32</sup>P-markierten RNA, 150.000 cpm eines durch Klenow-Auffüllreaktion <sup>32</sup>P-markierten, linearisierten pTZ-Plasmides zugegeben wurden.

Wie Fig. 1 zeigt, bindet die RNA-Fraktion unter den beschriebenen Bedingungen bereits ab Ethanolkonzentrationen größer 25 % an den mineralischen Träger, während die DNA-Fraktion erst ab Ethanolkonzentrationen größer 40 % bindet.

## Beispiele 2 bis 8

### *Isolierung von Gesamt-RNA*

In den folgenden Beispielen wurden zur Bindung an den mineralischen Träger die Alkohol/Salz-Gemische so gewählt (vgl. Fig. 1), daß eine selektive RNA-Bindung erreicht wurde.

Die Bindebedingungen wurden dabei auf die Art des jeweiligen Aufschlußmaterials (Gewebe, Zellkultur, Pflanzen, Bakterien) abgestimmt.

Die Beispiele verdeutlichen die Verwendung von GTC, GuHCl oder GTC/Ethanol-Gemischen zur Lyse der Ausgangsmaterialien. Die Integrität der isolierten RNA wurde durch Northern-blotting oder RT-PCR verifiziert.

Auf die Aufarbeitung der nicht an den Träger gebundenen DNA wurde in diesen Beispielen verzichtet. Die Aufreinigung von DNA aus dem Säulendurchbruch wird in Beispiel 12 gezeigt. Darüber hinaus kann die DNA durch Einstellung der in den Referenzbeispielen 1 bis 5 gewählten Bindebedingungen aufgereinigt werden.

#### Beispiel 2

##### *Isolierung von Gesamt-RNA aus Milzgewebe*

Aus 15 mg Milzgewebe (Maus) wurde Gesamt-RNA nach dem Standardprotokoll 4.1 isoliert. Das Gewebe wurde mit 350 µl L4 versetzt und homogenisiert, anschließend wurden 350 µl B4 zugegeben. Der erste Waschschriff wurde mit W3 durchgeführt, das Elutionsvolumen betrug 1 x 50 µl.



### Beispiel 3

#### *Isolierung von Gesamt-RNA aus Lebergewebe (A)*

In diesem Beispiel wurde ein ethanol-haltiger Lysepuffer verwendet, so daß das Standardprotokoll 4.1 leicht modifiziert wurde.

8 mg Lebergewebe (Ratte) wurden mit 700 µl L5 versetzt und homogenisiert. Das Lysat wurde auf die spin-Säule pipettiert und ab Schritt 3) das Standardprotokoll 4.1 durchgeführt. Der erste Waschschrift wurde mit W3 durchgeführt, das Elutionsvolumen betrug 1 x 50 µl.

### Beispiel 4

#### *Isolierung von Gesamt-RNA aus Lebergewebe (B)*

Aus 15 mg Lebergewebe (Ratte) wurde Gesamt-RNA nach dem Standardprotokoll 4.1 isoliert. Das Gewebe wurde mit 300 µl L6 versetzt und homogenisiert, anschließend wurden 175 µl B1 zugegeben. Der erste Waschschrift wurde mit W4 durchgeführt, das Elutionsvolumen betrug 1 x 50 µl.

### Beispiel 5

#### *Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen*

Aus  $1 \times 10^7$  HeLa-Zellen wurde Gesamt-RNA parallel nach den Standardprotokollen 4.1 und 4.2 isoliert. Die Zellen wurden jeweils mit 350 µl L7 versetzt und homogenisiert, anschließend wurden je 350 µl B4 zugegeben. Im Ansatz für die "batch-Prozedur" (4.2) wurden zusätzlich 50 µl Silica-Suspension zugegeben. Der erste Waschschrift wurde mit W3 durchgeführt, das Elutionsvolumen betrug 1 x 50 µl.

Beispiel 6*Isolierung von Gesamt-RNA aus Tabak*

Zur Gesamt-RNA-Isolierung aus Pflanzen wird das Standardprotokoll 4.1 leicht modifiziert. Nach Schritt 1) des Protokolls (Lyse), wird ein Zentrifugationsschritt bei 5.000 Upm in einer Tischzentrifuge eingefügt, um nicht lysierte Zellbestandteile, wie z.B. Faserreste, abzutrennen. Der Überstand wird abgenommen, mit Bindungsreagenz versetzt und ab Schritt 2) nach der Standardprozedur weiterverarbeitet.

Aus 100 mg Tabakblättern wurde Gesamt-RNA nach dem für Pflanzen modifizierten Standardprotokoll 4.1 isoliert. Das pulverisierte Zellmaterial wurde mit 600 µl L2 versetzt und homogenisiert, anschließend wurden 350 µl B4 zugegeben. Der erste Waschschrift wurde mit W3 durchgeführt, das Elutionsvolumen betrug 1 x 50 µl.

Beispiel 7*Isolierung von Gesamt-RNA aus E.coli*

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Bakterien wird vor der Durchführung des Standardprotokolls ein zusätzlicher Arbeitsschritt eingefügt, um die Zellwände der Bakterien zu lysieren. Hierzu wird das Zellpellet in 400 µg/ml Lysozym in TE resuspendiert und 5 min auf Eis sowie 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird nach der Standardprozedur lysiert.

Aus  $1 \times 10^9$  E.coli wurde Gesamt-RNA nach dem für Bakterien modifizierten Standardprotokoll 4.1 isoliert. Das Pellet wurde in 80 µl 400 µl/ml Lysozym in TE resuspendiert und wie oben

beschrieben inkubiert. Anschließend wurden 270  $\mu$ l L2 zugegeben, homogenisiert und 350  $\mu$ l B4 zugegeben. Der erste Waschschrift wurde mit W3 durchgeführt, das Elutionsvolumen betrug 2 x 50  $\mu$ l.

### Beispiel 8

#### *Selektive RNA-Bindung durch Optimierung des Waschpuffers*

Wie dieses Beispiel zeigt, können durch Optimierung des im ersten Waschschriftes verwendeten Waschpuffers (Standardprotokoll 4.1.5) DNA-Kontaminationen von der spezifisch gebundenen RNA entfernt werden.

1 x 10<sup>6</sup> HeLa-Zellen wurden jeweils nach Standardprotokoll 4.1 in 350  $\mu$ l L4 lysiert, mit 350  $\mu$ l B4 versetzt und an den Silica-Träger gebunden. Die Proben wurden dann im ersten Waschschrift mit folgenden Waschpuffer gewaschen:

Probe	Waschpuffer		
Nr.	M GTC	25 mM TRIS/HCl pH 7.5	% Ethanol
1	0.3	+	5
2	0.6	+	5
4	0.9	+	5
4	0.3	-	5
5	0.6	+	5
6	0.9	-	5
7 - 12	wie 1-6, jedoch 10 % EtOH		
8 - 18	wie 1-6, jedoch 20 % EtOH		
R*)	1.75	-	35

\*) Die Probe diente als Referenz; die Zusammensetzung des Waschpuffers entsprach den Bindebedingungen

Tab. 1      Zusammensetzung der Waschpuffer zum Auswaschen von  
DNA-Kontaminationen

Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach dem Standardprotokoll; das Elutionsvolumen betrug  $1 \times 50 \mu\text{l}$ .

Die Hälfte des Eluates wurde auf einem 1,2 % Formaldehydgel analysiert (vgl. Fig. 2). Das Gel wurde anschließend wie unter "elektrophoretische Methoden" beschrieben mit RNaseA behandelt (vgl. Fig. 3).

Legende zu Figuren 2 und 3

Fig. 2: 1,2 % Formaldehydgel zur Analyse der Eluate aus Beispiel 8, Bindebedingungen: 1,75 M GTC, 12.5 m; , Nacitrat pH 7.5, 35 % Ethanol; Waschbedingungen: vgl. Tab. 1. Die Benennung der Spuren entspricht der Bezeichnung der Proben in Tabelle 1.

Fig. 3: RNase-Dau des Geles Fig. 2

#### Beispiele 9 und 10

#### *Isolierung von DNA*

In den nachfolgend aufgeführten Beispielen 9 und 10 wurden die Bindebedingungen so gewählt, daß nur die DNA an den mineralischen Träger binden kann, während die RNA durchbricht.

Auf die Aufarbeitung der nicht an den Träger gebundenen RNA wurde in diesen Beispielen verzichtet. Die Aufreinigung von RNA aus dem Säulendurchbruch wird in Beispiel 11 gezeigt. Darüberhinaus kann die RNA im Säulendurchbruch durch Einstellung der in Beispiel 2 bis 8 gewählten Bindebedingungen aufgereinigt werden.

Die selektive DNA-Bindung erfolgt im Lysepuffer in Abwesenheit von Alkohol, d.h. Schritt 2) der Standardprotokolle 4.1 und 4.2 entfällt.

#### Beispiel 9

##### *Isolierung von genomischer DNA aus Nierengewebe*

10 mg Nierengewebe (Ratte) wurde in 700  $\mu$ l L8 lysiert. Die DNA wurde ohne Zugabe von Bindungsreagenz an den mineralischen Träger gebunden und im ersten Waschschrift mit 700  $\mu$ l L8 gewaschen. Danach wurde das Standardprotokoll 4.1 ab Schritt 6) durchgeführt. Das Elutionsvolumen betrug 2 x 50  $\mu$ l.

#### Beispiel 10

##### *Isolierung von genomischer DNA aus HeLa-Zellen*

$1 \times 10^7$  HeLa-Zellen wurden in 700  $\mu$ l L9 lysiert. Die DNA wurde ohne Zugabe von Bindungsreagenz an den mineralischen Träger gebunden und im ersten Waschschrift mit 700  $\mu$ l L9 gewaschen. Danach wurde das Standardprotokoll 4.1 ab Schritt 6) durchgeführt. Das Elutionsvolumen betrug 2 x 50  $\mu$ l.

#### **Beispiele 11 bis 13**

##### *Trennung von Gesamt-RNA und genomischer DNA*

Die nachfolgenden Beispiele 11 bis 13 zur getrennten Aufarbeitung von RNA und DNA aus demselben Zell-Lysat stellen Verknüpfungen der oben aufgeführten Beispiele zur RNA-, DNA- bzw. Gesamtnukleinsäureisolierung dar.

Die Trennung kann entweder durch differentielle Bindung oder durch fraktionierte Elution von RNA und DNA erfolgen.

### Beispiele 11 und 12

#### *Trennung von Gesamt-RNA und genomischer DNA durch differentielle Bindung*

Zur differentielle Bindung gibt es wiederum zwei Möglichkeiten:

Nach der Lyse können die Bedingungen entweder so gewählt werden, daß zunächst die DNA an den mineralischen Träger bindet (Beispiel 11), oder aber die RNA kann im ersten Bindungsschritt adsorbiert werden, während die DNA aus dem Durchbruch aufgearbeitet wird (Beispiel 12).

##### Beispiel 11

##### *Isolierung von genomischer DNA und Gesamt-RNA aus Nierengewebe*

10 mg Nierengewebe (Ratte) wurden in 350 µl L8 lysiert und die DNA im Lysepuffer an den mineralischen Träger gebunden. Zum Säulendurchbruch wurden 350 µl B4 gegeben und analog Beispiel 3.1 die Gesamt-RNA isoliert. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte wie in Referenzbeispiel 1.

##### Beispiel 12

##### *Isolierung von Gesamt-RNA und genomischer DNA aus Lungengewebe*

Aus 20 mg Lungengewebe (Ratte) wurde die Gesamt-RNA wie in Beispiel 2 beschrieben isoliert. Die nicht-gebundene genomische DNA im Säulendurchbruch wurde isoliert, indem 350 µl B1 und 350 µl B5 zugegeben wurden und die DNA wie in Standardprotokoll 4.1 beschreiben an den mineralischen Träger gebunden wurde. Der ersten Waschschrift wurde mit W1 durchgeführt, das Elutionsvolumen betrug 2 x 50 µl.

Beispiel 13*Trennung von Gesamt-RNA und genomischer DNA durch fraktionierte Elution*

Das folgenden Beispiel verdeutlicht die selektive Elution der DNA-Fraktion der an den mineralischen Träger gebundenen Gesamtnukleinsäure.

Die Bindebedingungen werden so gewählt, daß die Gesamtnukleinsäure an den mineralischen Träger bindet. Die DNA-Fraktion wird anschließend eluiert, während die RNA-Fraktion gebunden bleibt. Die eluierte DNA wird durch erneutes Einstellen auf DNA-Bindebedingungen (vgl. Fig. 1) an einen weiteren mineralischen Träger gebunden und aufgearbeitet.

*Isolierung von genomischer DNA und Gesamt-RNA aus Lebergewebe*

15 mg Lebergewebe (Schwein) wurden nach Standardprotokoll 4.1 1) bis 4) in 300  $\mu$ l L2 lysiert, mit 250  $\mu$ l B1 versetzt und die Gesamtnukleinsäure an den mineralischen Träger gebunden. Die DNA-Fraktion wurde mit 300  $\mu$ l W5 eluiert, während das Trägermaterial mit der noch gebundenen RNA-Fraktion ab 5) nach dem Standardprotokoll 4.1 behandelt wurde. Die DNA-Fraktion wurde aus dem Eluat durch Zugabe von 350  $\mu$ l B1 und 250  $\mu$ l B5 und Bindung an einen weiteren mineralischen Träger nach dem Standardprotokoll 4.1 isoliert.

### A n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Trennung von doppel- und einzelsträngigen Nukleinsäuren aus diese Stoffe enthaltenden Quellen, wobei eine Probe mit mindestens einem mineralischen Träger behandelt wird, wobei
  - 1.1 die Behandlungsbedingungen durch ein wäßriges Gemisch von Salzen und Alkoholgruppen enthaltenden Substanzen so eingestellt sind, daß überwiegend die einzelsträngige Nukleinsäure enthaltende Fraktion an einem ersten mineralischen Träger adsorbiert wird, während die doppelsträngige Nukleinsäure nicht adsorbiert wird, woraufhin die am ersten mineralischen Träger adsorbierte einzelsträngige Nukleinsäure, nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten, eluiert wird unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser, und für die nicht adsorbierte doppelsträngige Nukleinsäure, die aufgefangen wurde, anschließend durch ein entsprechendes wäßriges Gemisch von Salzen und Alkoholgruppen enthaltenden Substanzen solche Bedingungen eingestellt werden, daß diese insbesondere an einem zweiten mineralischen Träger adsorbierbar und, nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten, vom zweiten mineralischen Träger eluierbar wird unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser

oder



- 31 -

- 1.2 die Behandlungsbedingungen so eingestellt sind, daß Erdalkali-Ionen komplexierende Substanzen in Abwesenheit von Alkoholgruppen enthaltenden Substanzen in der Lösung enthalten sind, die einzelsträngige Nukleinsäure unter diesen Behandlungsbedingungen nicht an einem ersten mineralischen Träger adsorbiert wird und von der übrigen Probe abgetrennt wird, die doppelsträngige Nukleinsäure jedoch überwiegend an den ersten mineralischen Träger bindet, woraufhin die einzelsträngige Nukleinsäure, nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten, eluiert wird unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser und für die nicht adsorbierte einzelsträngige Nukleinsäure anschließend durch Zugabe von Alkoholgruppen enthaltenden Substanzen Bedingungen eingestellt werden, so daß die einzelsträngige Nukleinsäure dann insbesondere an einen zweiten mineralischen Träger adsorbierbar wird und, nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten, vom zweiten mineralischen Träger eluierbar wird unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser

oder

- 1.3 die Behandlungsbedingungen so eingestellt sind, daß Netz-, Wasch- oder Dispergiermittel in Abwesenheit von Alkoholgruppen aufweisenden Substanzen in der Lösung enthalten sind und die einzelsträngige Nukleinsäure unter diesen Behandlungsbedingungen nicht an einem ersten mineralischen Träger adsorbiert wird und von der übrigen Probe abgetrennt wird, die doppelsträngige Nukleinsäure jedoch überwiegend an den ersten mineralischen Träger bindet, woraufhin die doppelsträngige Nukleinsäure, nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten, vom ersten mineralischen Träger eluiert wird unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser und für die nicht ad-

sorbierte aufgefangene einzelsträngige Nukleinsäure anschließend durch Zugabe von Alkoholgruppen enthaltenden Substanzen Bedingungen eingestellt werden, so daß die einzelsträngige Nukleinsäure dann insbesondere an einem zweiten mineralischen Träger adsorbierbar und, nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten, eluierbar wird unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser

oder

- 1.4 die Behandlungsbedingungen durch ein entsprechendes wäßriges Gemisch von Salzen und Alkoholgruppen enthaltenden Substanzen so eingestellt sind, daß die Gesamtnukleinsäure (einzeln- oder doppelsträngige) an einem ersten mineralischen Träger adsorbiert wird, gefolgt von einer Fraktionierung der an den Träger gebundenen einzel-/doppelsträngigen Nukleinsäuren durch Elution der einzel-/doppelsträngigen Nukleinsäuren vom ersten mineralischen Träger durch selektive Elution der doppelsträngigen Nukleinsäure mittels Behandlung mit einer Lösung verminderter Ionenstärke und Konzentration einer Alkoholgruppen enthaltenden Substanz oder Elution der einzelsträngigen Nukleinsäure mittels einer Lösung enthaltend eine Erdalkali-Ionen komplexierende Substanz und/oder ein Netz-, Wasch- oder Dispergiermittel sowie eine oder mehrere Salzarten,

wobei die jeweils andere Nukleinsäure an dem ersten mineralischen Träger gebunden bleibt und, nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten, vom ersten mineralischen Träger eluiert wird unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser und für die vorher vom ersten mineralischen Träger eluierte doppel- oder einzelsträngige Nukleinsäure anschließend durch Erhöhung der Ionenstärke oder Konzentra-

- 33 -

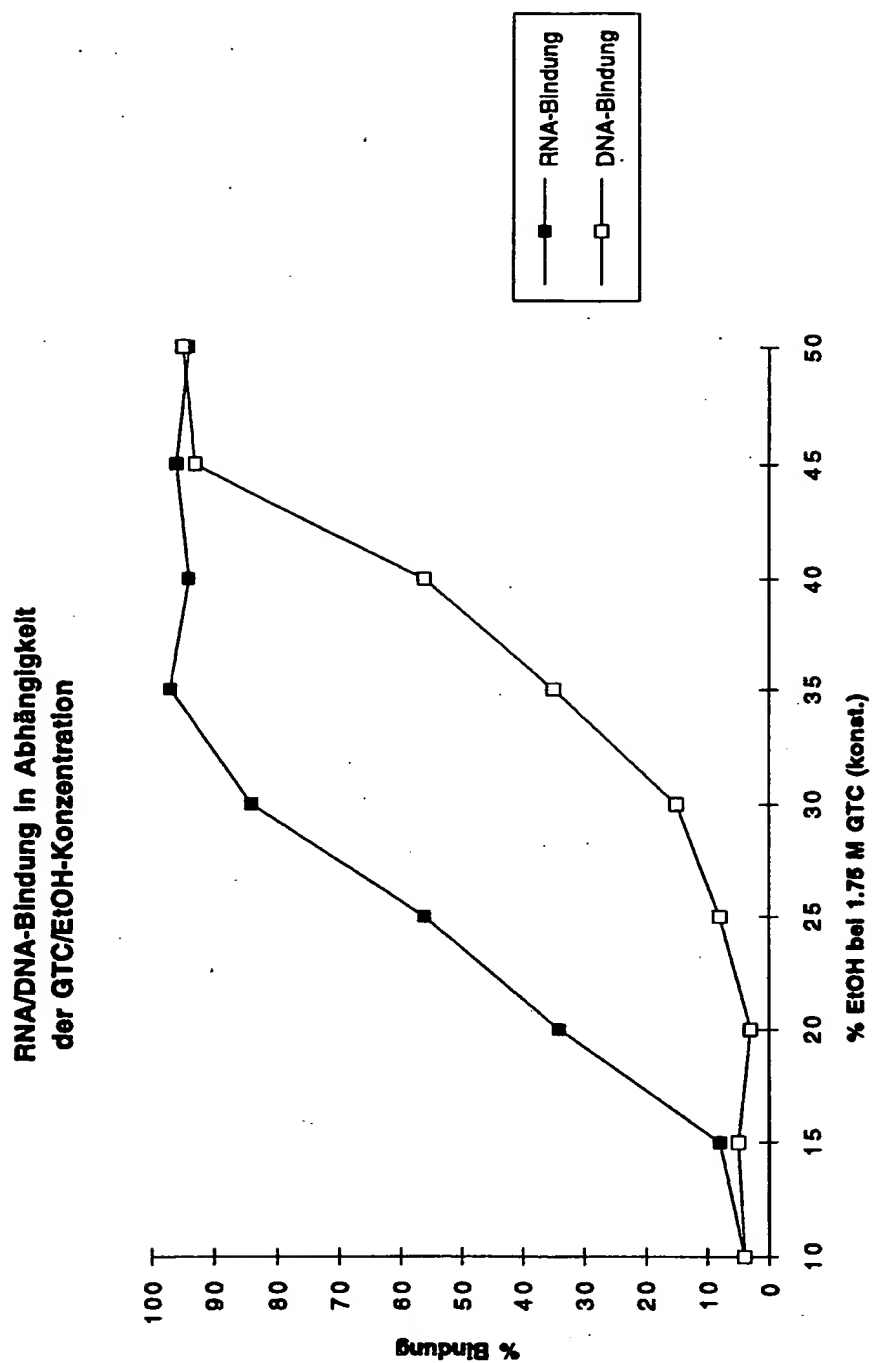
tion Alkoholgruppen enthaltenden Substanzen Behandlungsbedingungen eingestellt werden, die insbesondere zur Adsorption der doppel-/einzelsträngigen Nukleinsäure an einem zweiten mineralischen Träger führen kann und, nach gegebenenfalls durchgeführten Waschschritten, eluierbar wird unter Bedingungen geringer Ionenstärke oder mit Wasser.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das System zur Lysierung der die Nukleinsäuren enthaltenden Quellen chaotrope Substanzen in einer Konzentration von 0,1 bis 10 M enthält.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, wobei die Nukleinsäuren enthaltende Quelle mit einer Lösung versetzt wird, die Natriumperchlorat, Guanidiniumhydrochlorid, Guanidinium-iso-thiocyanat Guanidinium-thiocyanat, Natriumjodid, Kaliumjodid und/oder Kombinationen davon in einer Konzentration von 0,1 bis 10 M enthält.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Nukleinsäuren enthaltende Quelle mit einer Lösung versetzt wird, die Natriumchlorid, Lithiumchlorid, Kaliumchlorid, Natriumacetat, Magnesiumchlorid, Harnstoff und/oder Kombinationen davon in einer Konzentration von 0,1 bis 10 M enthält.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Alkoholgruppen aufweisenden Substanzen niedere aliphatische Alkohole wie Methanol, Ethanol, Isopropanol, Butanol und Pentanol in einer Konzentration von 1 bis 90 Vol.-% sind und die Salze, wie NaCl, KCl, LiCl,  $MgCl_2$ , NaAc, in Konzentration von 1 bis 10 M vorliegen.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der mineralische Träger aus porösen oder nicht porösen Metalloxiden oder Metallmischoxiden, Silicagel, Materialien, die überwiegend aus Glas bestehen, wie nicht modifizierten Glaspartikeln, Glasmehl, Quarz, Aluminiumoxid, Zeolithe, Titandioxid, Zirkondioxid aufgebaut ist mit einer Partikelgröße des mineralischen Trägermaterials von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 1.000  $\mu\text{m}$  und einer Porengröße von 2 bis 1.000  $\mu\text{m}$ , und das poröse oder nicht poröse Trägermaterial in Form loser Schüttungen vorliegen kann oder, die Trägermaterialien als Filterschichten ausgebildet sind in Form von Filterschichten aus Glas, Quarz oder Keramik und/oder einer Membran, in der Silicagel angeordnet ist und/oder als Partikel oder Fasern aus mineralischen Trägern und Geweben aus Quarz oder Glaswolle vorliegen sowie Latexpartikel mit oder ohne funktionellen Gruppen sind oder Frittenmaterialien aus Polyethylen, Polypropylen, Polyvinyliden-fluorid, insbesondere ultra high molecular weight Polyethylen, high density Polyethylen sind.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die biologische Quelle Zellkulturen, Gewebe jeder Art, Körperflüssigkeiten wie Blut, Plasma, Serum, Urin, Faeces, Mikroorganismen wie Bakterien, Viren wie Cytomegalie-Virus, HIV, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis- $\delta$ -Virus, Pflanzen, Pflanzenteile, Embryonen, Keimlinge, Früchte ist oder die Nukleinsäuren enthaltende Probe Gemische sind, die nach enzymatischen Reaktionen wie in vitro Transkription und/oder cDNA-Synthese und/oder reverse Transkription mit anschließender PCR anfallen.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Zellen zunächst in einem wäßrigen Lyse-System enthaltend chaotrope Substanzen oder andere Salze aufgeschlossen (lysiert) werden oder damit versetzt werden.

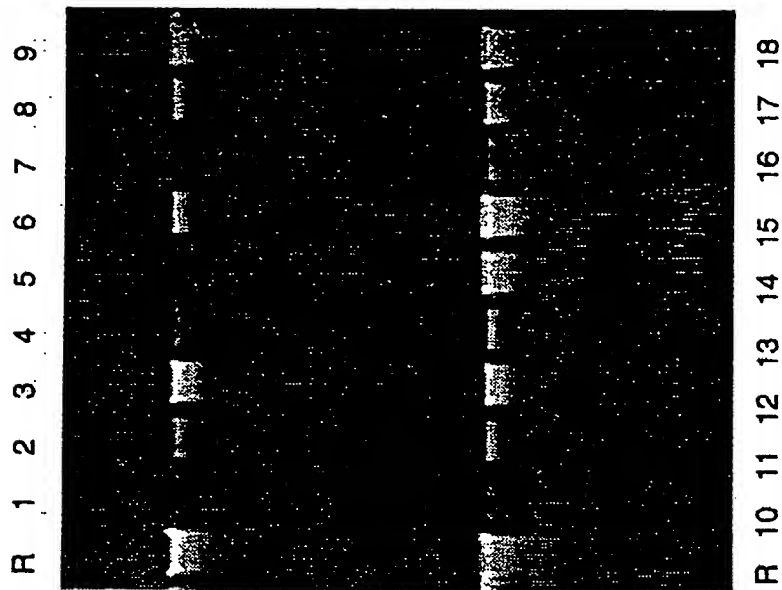
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei jeweils die erhaltenen Fraktionen durch weitere chromatographische Schritte gereinigt werden.
10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Erdalkali-Ionen bindende Substanz Ethylendi-amintetraessigsäure (EDTA) oder EGTA und das Netz-, Wasch- oder Dispergiermittel ein Sarkosinat ist.
11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die einzelsträngige Nukleinsäure RNA und die doppelsträngige Nukleinsäure DNA ist.
12. Eine wäßrige Lösung enthaltend 0,5 bis 3,0 M Guanidinium-thiocyanat und/oder Guanidinhydrochlorid, 1 bis 50 % Ethanol und/oder Isopropanol.
13. Verwendung der Lösung nach Anspruch 12 als Puffer zur Lyse von nukleinsäurehaltigen Quellen und/oder Bindung von Nukleinsäuren an mineralische Träger.
14. Eine wäßrige Lösung enthaltend 0,1 bis 3 M Guanidin-thiocyanat und/oder Guanidinhydrochlorid, 1 bis 30 % Ethanol und/oder Isopropanol.
15. Verwendung der Lösung nach Anspruch 14 als Puffer zum Auswaschen von an mineralische Träger gebundenen Nukleinsäuren.
16. Eine wäßrige Lösung enthaltend 1 bis 5 M Guanidin-thiocyanat und/oder 1 bis 8 M Guanidinhydrochlorid, 0,1 bis 3 % Sarkosyl.
17. Verwendung der Lösung nach Anspruch 16 als Puffer zum Binden von DNA an mineralische Träger.

18. Verwendung einer Lösung enthaltend 0,5 bis 8,0 M Guanidiniumthiocyanat und/oder Guanidiniumhydrochlorid, 1 bis 50 % Ethanol und/oder Isopropanol.
19. Eine wäßrige Lösung enthaltend 1 bis 5 M Guanidiniumthiocyanat und/oder 1 bis 8 M Guanidiniumhydrochlorid, 5 mM bis 200 mM EDTA oder EGTA.
20. Verwendung der Lösung gemäß Anspruch 19 als Puffer zum Binden von DNA, doppelsträngiger Nukleinsäure an mineralischen Träger.
21. Verwendung der Lösung nach Anspruch 19 als Puffer um einzelsträngige Nukleinsäure (RNA) nicht an mineralischen Träger zu binden.
22. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11 mit mineralischem Träger, der in einem zum Durchfluß geeigneten Hohlkörper angeordnet ist, Lösungen gemäß einem der Ansprüche 12, 14, 16 und/oder 19 sowie weiteren Hilfsstoffen und/oder Zubehör.
23. Verwendung der nach dem Verfahren isolierten Nukleinsäuren in Amplifikationsreaktionen, wie PCR, LCR, NASBA oder 3SR zur medizinischen Diagnostik.
24. Verwendung der nach dem Verfahren isolierten Nukleinsäuren zur medizinischen Diagnostik ohne Einsatz von Amplifikationsreaktionen.

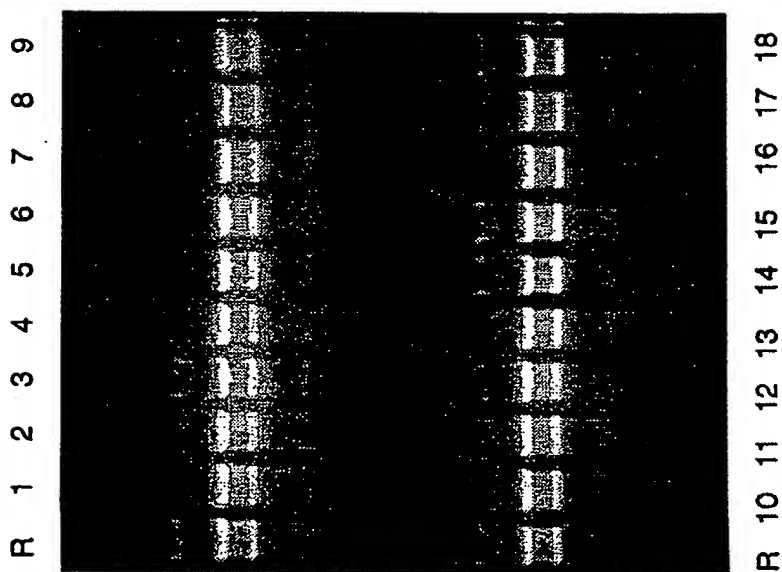


Figur 1

BEST AVAILABLE COPY



Figur 3



Figur 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/00445

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07H1/08 C07H21/00 C12N15/10 C12P19/34 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07H C12N C12P C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US-A-5 155 018 (GILLESPIE D. AND CUDDY K.K.) 13 October 1992 cited in the application see the whole document ---	1
A	US-A-5 075 430 (5075430) 24 December 1991 cited in the application see column 3, line 44 - line 47; claims ---	1
A	EP-A-0 389 063 (AKZO N.V.) 26 September 1990 see the whole document ---	1
A	EP-A-0 580 305 (ADVANCED GENETIC TECHNOLOGIES CORPORATION) 26 January 1994 see column 6, line 16 - column 7, line 35 ---	1
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 June 1995

Date of mailing of the international search report

06.07.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tr. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Day, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No

PCT/EP 95/00445

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP-A-0 325 032 (MITSUI TOATSU CHEMICALS INCORPORATED) 26 July 1989 see page 4, line 56 - page 5, line 2; claims; figures; example 1 ----	1
A	WO-A-93 11221 (DIAGEN INSTITUT FUR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 10 June 1993 see the whole document & DE-A-41 39 664 cited in the application ----	1
A	JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 243, 1982 AMSTERDAM (NL), pages 301-306, EGLY J.M. ET AL 'Separation of single-stranded from double-stranded nucleic acids using acriflavin-agarose chromatography' see abstract ----	1
X	EP-A-0 111 916 (MEMORIAL HOSPITAL FOR CANCER AND ALLIED DISEASES) 27 June 1984 see page 4; claim 13 ----	18,19
X	WO-A-91 18116 (VAN NESS J:) 28 November 1991 see page 13, line 31 - line 33 ----	16
X	J. CHROMATOGR. (1985), 324(1), 173-80 CODEN: JOCRAM;ISSN: 0021-9673, SHARIFI, BEHROOZ G. ET AL 'Use of a urea and guanidine-hydrochloric acid-propanol solvent system to purify a growth inhibitory glycopeptide by high-performance liquid chromatography' see page 177 - page 178 -----	12,14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 95/00445

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-5155018	13-10-92	NONE	
US-A-5075430	24-12-91	NONE	
EP-A-389063	26-09-90	NL-A- 8900725	16-10-90
		AU-B- 641641	30-09-93
		AU-A- 5215390	27-09-90
		CA-A- 2012777	23-09-90
		JP-A- 2289596	29-11-90
		US-A- 5234809	10-08-93
EP-A-580305	26-01-94	JP-A- 6078769	22-03-94
EP-A-325032	26-07-89	JP-A- 1135792	29-05-89
WO-A-9311221	10-06-93	DE-A- 4139664	03-06-93
		WO-A- 9311218	10-06-93
		EP-A- 0616638	28-09-94
		EP-A- 0616639	28-09-94
		JP-T- 7501222	09-02-95
		JP-T- 7501223	09-02-95
EP-A-111916	27-06-84	US-A- 4493892	15-01-85
		JP-A- 59125900	20-07-84
WO-A-9118116	28-11-91	US-A- 5232830	03-08-93
		EP-A- 0455905	13-11-91
		JP-A- 4020300	23-01-92

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 95/00445

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C07H1/08 C07H21/00 C12N15/10 C12P19/34 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07H C12N C12P C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US-A-5 155 018 (GILLESPIE D. AND CUDDY K.K.) 13.Oktober 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1
A	US-A-5 075 430 (5075430) 24.Dezember 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 3, Zeile 44 - Zeile 47; Ansprüche ---	1
A	EP-A-0 389 063 (AKZO N.V.) 26.September 1990 siehe das ganze Dokument ---	1
A	EP-A-0 580 305 (ADVANCED GENETIC TECHNOLOGIES CORPORATION) 26.Januar 1994 siehe Spalte 6, Zeile 16 - Spalte 7, Zeile 35 ---	1
-/--		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30.Juni 1995

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

06.07.95

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Day, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP-A-0 325 032 (MITSUI TOATSU CHEMICALS INCORPORATED) 26.Juli 1989 siehe Seite 4; Zeile 56 - Seite 5, Zeile 2; Ansprüche; Abbildungen; Beispiel 1 ---	1
A	WO-A-93 11221 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 10.Juni 1993 siehe das ganze Dokument & DE-A-41 39 664 in der Anmeldung erwähnt ---	1
A	JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, Bd. 243, 1982 AMSTERDAM (NL), Seiten 301-306, EGLY J.M. ET AL 'Separation of single-stranded from double-stranded nucleic acids using acriflavin-agarose chromatography' siehe Zusammenfassung ---	1
X	EP-A-0 111 916 (MEMORIAL HOSPITAL FOR CANCER AND ALLIED DISEASES) 27.Juni 1984 siehe Seite 4; Anspruch 13 ---	18,19
X	WO-A-91 18116 (VAN NESS J:) 28.November 1991 siehe Seite 13, Zeile 31 - Zeile 33 ---	16
X	J. CHROMATOGR. (1985), 324(1), 173-80 CODEN: JOCRAM; ISSN: 0021-9673, SHARIFI, BEHROOZ G. ET AL 'Use of a urea and guanidine-hydrochloric acid-propanol solvent system to purify a growth inhibitory glycopeptide by high-performance liquid chromatography' siehe Seite 177 - Seite 178 -----	12,14

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter-  
nationales Aktenzeichen  
PCT/EP 95/00445

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-5155018	13-10-92	KEINE	
US-A-5075430	24-12-91	KEINE	
EP-A-389063	26-09-90	NL-A- 8900725	16-10-90
		AU-B- 641641	30-09-93
		AU-A- 5215390	27-09-90
		CA-A- 2012777	23-09-90
		JP-A- 2289596	29-11-90
		US-A- 5234809	10-08-93
EP-A-580305	26-01-94	JP-A- 6078769	22-03-94
EP-A-325032	26-07-89	JP-A- 1135792	29-05-89
WO-A-9311221	10-06-93	DE-A- 4139664	03-06-93
		WO-A- 9311218	10-06-93
		EP-A- 0616638	28-09-94
		EP-A- 0616639	28-09-94
		JP-T- 7501222	09-02-95
		JP-T- 7501223	09-02-95
EP-A-111916	27-06-84	US-A- 4493892	15-01-85
		JP-A- 59125900	20-07-84
WO-A-9118116	28-11-91	US-A- 5232830	03-08-93
		EP-A- 0455905	13-11-91
		JP-A- 4020300	23-01-92